藥用植物之組織培養技術

蔡新聲
行政院農委會農業試驗所農藝系

摘要

藥用植物對人類健康極爲重要，我國傳統醫學用藥以植物性藥物爲主，歷經數千年而不衰，爲我國醫藥文化之重要資源，值得加以發揚光大。從生藥研究開發新藥製品之市場，在公元 2,000 年預期將會有大幅度的成長。目前所有藥物中，自生藥取得成分者約佔 25 %，而其應用範圍仍不斷增加。然而許多藥用植物之繁殖，常面臨世代過長、果實結實率極低、種子發芽不良及因異花授粉產生後代嚴重變異等困難；而部分已瀕臨絕種之珍稀藥用植物更應立刻加以保存，組織培養技術提供了解決這些問題的機會。過去十年中農業試驗所在國科會補助下，進行本土藥用植物-台灣金線連及大陸珍貴藥材-當歸之組織培養技術研究，本文敘述這兩種藥用植物利用組織培養之大量繁殖技術。又懸浮細胞除可做爲植物大量繁殖的材料外，亦可做爲二次代謝物生產的工廠。由於植物懸浮細胞不具色素，而且生合成之二次代謝物純化過程極爲簡單，如此不但大大降低了生產成本，而且提供週年生產的機會，因此利用植物懸浮細胞生產人類有用的重要醫療成分，前景亦大有可爲。本文也報導農業試驗所在國科會支持下，進行紅豆杉、柴胡、竹葉柴胡、當歸、山藥、銀杏及白芷等藥用植物細胞懸浮培養之初步研究成果。

前言

藥用植物對人類健康極爲重要，最近發現許多藥用植物對以化學藥品難以治療的人類疾病具有特殊療效。根據美國中醫藥研究所曾碧光所長的報導，甘草、紫花地丁、黃連、紫草、金銀花等 13 種中藥，發現具有抗 AIDS 病毒的效果。在天花粉裡分離出花粉蛋白成分 GLQ-223 具有抑制 AIDS 病毒的作用。銀杏果之抽出液可以有效促進腦部及周邊循環系統之血液循環，因而證實對老年痴呆（阿滋海默症）具有療效。日本人發現中藥的小柴胡湯具有治療肝炎的效果，美國也得到同樣的結果。葛根湯、小青龍湯對過敏症、關節炎，加工附子治療關節炎及當歸芍藥散治療更年期障礙效果非常顯著，這些都是西藥很難治療的病症。其他如高血壓、糖尿病、心臟病、腎臟病等西藥難以治療，或以西藥治療將產生嚴重副作用之疾病都可用中藥治療。因此很多美國醫院已開始使用中藥來彌補西藥之不

足，如一般抗癌藥物都具有損害人體組織尤其是肝、腎的副作用，爲降低這些副作用，給正在進行放射線或化學治療的病人，餵服靈芝人參黃耆湯、小柴胡湯及五苓散等中藥，可防止病人紅血球、白血球及血小板減少，其肝、腎功能經檢驗效果相當良好(21)。美國食品藥物管理局（FDA）已允許某些中藥可不經過 Phase I 試驗直接進入小型的 Phase II 試驗，一旦在 Phase II 試驗顯示出對人體具有某些療效，再回頭作 Phase I 的安全測試，此一彈性臨床試驗是專爲中藥而設計，顯示美國人也希望中藥是可以治病而非補品。目前全世界約有二百多個公私立研究單位投入生藥之研究，而台灣農業正處於轉型之關鍵階段，加入世界貿易組織將造成栽培作物經營上很大的衝擊，因此調整國內農業結構，朝向多元化及精緻化的方向發展極有必要，藥用植物之開發與利用符合此種需要。

研究方向與目標

中醫藥之科學化與本土化是政府的一貫政策，選定重點發展之藥用植物，適時、適地加以栽培，並進一步進行成分、品質分析及藥理、臨床等研究，爲其療效與價值提供科學性依據，實爲當務之急。過去十年來農試所組織培養研究室在國科會支持下，以瀕臨絕種之珍貴本土藥材--台灣金線連(*Anoectochilus formosanus* Hayata)，以及外來之大陸藥用植物--當歸(*Angelica sinensis* DIELS)爲主要研究對象，除利用組織培養技術繁殖珍稀藥材外，並嘗試建立利用懸浮細胞生產藥用成分之技術，茲將研究成果分述如下：

一、台灣金線連組織培養技術之應用與研究

臺灣金線連自何時起被應用於治療疾病已難考證，只知早期山地原住民曾服食或外用以治療病痛及蛇類咬傷；最近民間則流傳具有降血壓、降血糖、保肝及增強人體免疫力之功效。文獻上較早被採集的記錄，應在1892-1895年間(清光緒18-21年)由英國人Augustin Henry採得標本，後由日本人早田文藏氏定名爲 *Anoectochilus formosanus* Hayata。臺灣金線連屬於地生蘭類，適合生長在海拔高約 500-1800 公尺之原始林地，原本散見於全省各山區且數量繁多，民間視其性味甘、平，入肝、脾、腎三經，故常用爲清涼解熱、祛風活血、解鬱、強心、利尿 ，降血糖、降血壓，治肝亢、肝炎、肺病 、肺癆、腫傷、胸腹痛、遺漏、遺精、牙痛、小兒發育不良、蛇類咬傷及肝脾諸臟器疾病之滋養強壯劑。因相傳效用廣泛，故有藥王、藥虎、鳥蔘等別名。因售價昂貴因此野外採擷者日增，加以多年來坡地、林地濫墾濫伐，更促使野生族群銳減(16)。

台灣以人工栽培及繁殖台灣金線連雖早有報導，但技術的精進與各地產銷班的設立推廣，直到近年方見發展並逐漸成爲一項新興產業。由於鮮草批發價格極佳，平均每台斤(600g)可達

幣 2800-3200 元，因此農民種植興趣濃厚，但台灣金線連設施栽培易受 *Fusarium oxysporum* 病原菌感染引起之莖腐病，和由 *Pythium ultimum* 引起的基腐病侵襲，罹病園圃往往損失慘重，如以農藥全面噴灑控制，則要擔負藥物殘留及危害人體的風險，因此就長遠觀之，積極選育優良抗病或耐病品系，是減少藥物控制病害及增進本省農民收益，促進農村發展的有效措施。

農試所除有系統的探索台灣金線連之生態、生理及組織培養繁殖技術和配方之研究外，並以選育優良抗病品系為首一目標，現階段在基礎研究上已獲得數項重要及實用之成果，可提供農民與業者參考使用。例如將台灣金線連之莖節培養於含有5ppm BA及0.3%活性碳之固體MS基本培養基，可誘導8倍芽體之生成及根系之正常生長，達到大量繁殖之目的。若將莖節先培養於上述液體培養基3-4星期，再移植到含有5ppm BA及0.3%活性碳之固體MS基本培養基，則繁殖效果更佳(圖1)(11)。台灣金線連無菌播種之研究結果顯示，取人工授粉所得87.5% 果莢成熟度之種子(約授粉後第42-53天)，播種後萌芽率最高可達48.8-50.8% 左右；而相同果莢成熟度但在原生地經自然虫媒授粉所得種子，其播種萌芽率最高則可達78.3-86.1% ；無論是人工授粉或自然授粉，100% 果莢成熟度種子播種後之萌芽率皆低於87.5% 果莢成熟度者；果莢成熟度低於75% 之種子，播種後無萌芽跡象。無菌播種培養基配方以含1/2MS基本鹽類、3% 蔗糖及0.9% agar較佳，添加1 g/l Hyponex及1 g/l peptone有助於種子萌芽。以3% 過氧化氫溶液在播種前預處理87.5% 果莢成熟度種子3分鐘，容易導致幼嫩種胚死亡；但若預處理較老熟種子(成熟度100% 左右)，則能適度提高萌芽率，此可能因 3% 過氧化氫溶液除了有消毒殺菌功效外，並可洗除金線連老熟種子種皮所含之萌芽抑制物質，進而提高其發芽率。野生台灣金線連自然授粉之成熟果莢，以5±1℃、濕度100% 冷藏，至少可保存21天而不影響種子萌芽率；相同冷藏條件處理種子，則至少可保存15天；若種子置於25℃室溫下，則壽命僅能維持2天左右，顯示冷藏處理可有效延長台灣金線連種子壽命。至於在台灣金線連花朵授粉適期研究方面則顯示，不論人工自花或異花授粉，皆在花朵全開前1天至全開後10天內進行授粉較適合，而最佳授粉期為花朵全開後2－5天，此時授粉成功率可達85% ，且此種果莢之種子播種後，也有較高萌芽率(14, 15, 16)。

經多年努力，台灣金線連利用組織培養進行大量繁殖種苗等技術之開發，已獲得良好成果(圖 1-2)，並在歷年辦理之各種組織培養訓練班中，將相關技術介紹給受訓之學員，惟現階段受病害影響使栽培風險相對提高，因此選育優良抗病品系將是未來重要之研究方向。

二、當歸之組織培養研究

當歸 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels自古即爲我國之重要藥材，其功用甚廣，應用於許多中醫方劑，主治婦人疾患。當歸之傳統栽培法以種子爲材料，而其缺點是種子品質不易控制，因而影響當歸藥材之品質甚巨。台灣以往未曾有大陸川歸之栽培，倘能將川歸引種台灣妥爲發展，對我國因應加入世界貿易組織，規劃農民種植及對我大力推展科學化中藥之努力應具有正面意義。引種首需繁殖相當數量之苗木以供不同地區及海拔之試種栽培，而植物組織培養是取代傳統育種及栽培方式，大量繁殖苗木及提升當歸品質的良好方法。

利用當歸未熟胚於MS培養基中培養一個月後，可形成擬胚化癒合組織、正常植物體及不正常植物體三種材料。將擬胚化癒合組織培養於 NH_4^+：NO_3^-=1：2或1：4之MS固體培養基、25℃照光(2,000 lux)的條件下，其生長與增殖的情況較佳；而MS液體培養基可使擬胚化癒合組織形成懸浮細胞或團塊而繼續生長增殖，並進一步發育成體胚及體胚苗，達到大量繁殖的目地(圖3)(4, 8)。

利用當歸擬胚化癒合組織可進行懸浮細胞培養，懸浮細胞於慢速(80 rpm)及較大密度(2.5 ml PCV)下生長增殖較快，而快速(100 rpm)及較小密度(0.5 ml PCV)下則有利於形成體胚及體胚苗。因此，此擬胚化癒合組織除可產生體胚及體胚苗供繁殖大量苗木外(圖4)，亦可利用其生長增殖快速之懸浮細胞進行二次代謝物的生產。此外，利用懸浮細胞培養所形成的擬胚體則可用於製作人工種子的材料(6, 9, 17, 18, 19)。

除了上述兩種珍稀藥材之組織培養技術已被建立外，農試所目前已成功繁殖之珍稀藥用植物尙有半夏、地黃、桔梗、白及、白芷、沙參、玄參、黨參、何首烏、貝母、百合、虎杖、山藥、知母、柴胡、烏夫蓉、綬草、黃耆、延胡索及草烏等三十餘種。

三、利用細胞及癒合組織生產抗癌及其他醫療成分之組織培養技術

最近研究發現許多藥用植物之二次代謝物(藥用成分)具有抗癌、治療糖尿病、心血管疾病、AIDS及老人癡呆症的功效，例如太平洋紫衫(或紅豆杉)生產taxol、非洲矮柳樹生產抗癌藥物、periwinkle生產vincristin、*Plumbago zyalancia*生產plumbagin、*Catharanthus roseus*生產vincristin及Algae生產Beta-carotene均具有治療各種癌症之效果；蕈類抽取之多種植物鹼(alkaloids)成分，對目前尙無藥物可治療的巴金森症(Parkinson's disease)具有療效。而這種蕈類植物鹼也已確定可有效治療結核病。Periwinkle植物所抽取之成分vinpocentine，對目前尙無藥物可治療的老年癡呆阿滋海默症(Alzheimer's disease)具有特殊療效；而vinpocentine成分在蕈類內的特定型式，已確定有很好的抗關節炎效果(13)。以銀杏葉片抽取之植物鹼(alkaloids)成分可防止細胞衰老(5)。以上所述之藥用植物，均爲目前及未來可供研究的對象，亦將在未

式，已確定有很好的抗關節炎效果(13)。以銀杏葉片抽取之植物鹼(alkaloids)成分可防止細胞衰老(5)。以上所述之藥用植物，均爲目前及未來可供研究的對象，亦將在未來的生藥市場佔有一席之地。

懸浮細胞除可做爲植物大量繁殖的材料外，亦可做爲二次代謝物生產的工廠。由於植物懸浮細胞不具色素，而且生合成之二次代謝物純化過程極爲簡單，如此不但大大降低了生產成本，而且提供周年生產的機會，因此細胞懸浮培養及細胞篩選技術是從植物生產有效醫療成分的重要過程。部份從事細胞培養和其他生物技術研究之公司及研究單位，已可利用遺傳工程基因重組之細胞，來大量生產具醫療成分之產品，並可確切大量生產所需的有效醫療成分。例如加拿大多倫多大學的Innovation Fundation，利用RNA病毒進入植物細胞內可大量複製的特性，運用重組基因的遺傳工程技術，做出了符合需要的植物細胞，而大量生產有效成分。利用細胞組織培養生產有效醫療成分之過程可分爲下面幾個階段：

(一)誘導癒合組織及建立細胞懸浮培養。

(二)利用生長良好的癒合組織或懸浮細胞生產主要藥用成分。

(三)篩選高產藥用成分之細胞株，以外加誘引劑或改變培養方式，提高癒合組織或懸浮細胞之產能。

(四)純化及萃取技術之建立。

(五)臨床試驗。

農試所在國科會支持下，細胞懸浮培養初期的研究工作以紅豆杉、柴胡、竹葉柴胡、當歸、山藥、銀杏及白芷等作物爲主，也已獲得相當的成果(1, 2, 3, 7, 10, 12, 20, 22, 23)；例如工研院、永豐餘公司及農試所合作的紅豆杉組織培養技術，發現葉片癒合組織所建立的懸浮細胞，紅豆杉醇的產量已可高達200 mg/l，具有工業化量產的水準(10)。中國醫藥學院與農試所進行之白芷葉柄癒合組織之懸浮細胞培養，經由XAD-7等高分子吸附劑或誘引劑的處理，可使形成的白芷素（imperatorin）比對照組高出140倍之多(1, 2, 20)；山藥由零餘子所誘導的癒合組織，diogenin含量高達3.3%，比原植物體高出許多(7, 23)；柴胡、當歸及銀杏之懸浮細胞亦具有合成柴胡皂素(saikosaponin)、阿味酸(ferulic acid, 當歸之指標成分) 及銀杏內酯(ginkgolide B)之能力(5, 18, 22)。這些結果顯示經由細胞懸浮培養技術生產人類有用的藥用成分是可能的。

結語

台灣自然環境十分優越，境內高山平原處處，氣候更兼具溫帶、亞熱帶及熱帶三帶，植物資源豐富，素有天然大植物園之美譽。台

灣原生維管束植物多達4,477種，加上外來的2,500餘種，總數約近7,000種，其中經生藥學家鑑定、評估、確認其療效之種類甚多，唯目前大多數均已瀕臨絕種，選取較重要的數種藥材，開發爲保健及藥用以供農民栽培種植，是目前當務之急。又根據統計數字顯示，我國進口用於臨床之中藥藥材每年高達新台幣兩百億元，大陸進口僞藥充斥國內，消費者漸有本土生產藥用植物之認知；針對原生藥用植物之藥效與進口品相同者進行篩選，在各地區依其特殊之環境條件，生產具特色且質優之產品，藉而提供產銷所需，促使產製銷本土化，以減少外匯之外流，對我國經濟之發展將大有助益。又國內基因構築等分子生物與組織培養技術已臻成熟，具有利用植物細胞生產二次代謝物之量產基礎。此外，又由於環境污染導致癌症等文明病之流行，保健飲料日益受到重視，發展保健藥用植物正逢其時。

參考文獻

1. Chang, W. D., C. C. Chen, Y. S. Chang and H. S. Tsay. 1993. Studies on tissue culture of *Angelica dahurica* var. formosana. I. Callus induction and medium evaluation. J. Agric. Res. China 42:253-264.
2. Chang, W. D., W. W.Huang, C. C. Chen, Y. S. Chang and H. S. Tsay. 1994. The production of secondary metabolites from Chinese medicinal herbs by suspension cell and tissue culture. Proc. 7th International Congress of SABRAO and WSAA. Nov. 16-21, 1993, Academic Sinica, Taipei, Taiwan. pp.535-540
3. Chen, C. C., W. D. Chang, Y. S. Chang and H. S. Tsay. 1994. Studies on tissue culture of *Angelica dahurica* var. formosana. II. Establishment of cell suspension culture and evaluation of cultural conditions. J. Chinese Medicine 5:123-134.
4. Chen, U. C., H. L. Huang, C. C. Chen and H. S. Tsay. 1998. Studies on tissue culture of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. (III) Influence of MS salts and sucrose concentration, media state and pH value on the production of somatic embryos and germinating embryos from culture suspension cell. Agric. Assoc. China 183: 79-87.
5. Ho, J. J. 1998. Studies on callus and suspension cell culture of *Ginkyo biloba*. Master thesis, Graduate Institute of Biotechnology, National Tung-Hwa University, Hwa-Lin, Taiwan.
6. Huang, H. L. and H. S. Tsay. 1998. Somatic embryo formation and germination from immature embryo-derived suspension cultured cells of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. Plant Cell Rep.17:670-674.
7. Huang, W. W., C. C Chen, F. T. Yeh and H. S. Tsay. 1993. Tissue culture of *Dioscorea doryophora* Hance. I. Callus induction from different source organs and the measurement of diosgenin content. Chin. Med. Coll. J. 2:151-161.

9. Huang, H. L., C. C. Chen, U. C. Chen and H. S. Tsay. 1998. Studies on tissue culture of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. (II) Influence of culture methods on somatic embryos formation from culture suspension cell. Chinese Agron. J. 7 (In press).
10. Lee, C. Y., F. L. Lin, Y. L. Yang, C. T. Chang, L. H. Wang, H. L. Wei and H. S. Tsay. 1995. Taxol production by cell cultures of *Taxus Mairei*. Proc. Symp. on development and utilization of resources of medicinal plants in Taiwan. Taiwan Agric. Res. Inst, April 21, 1995. TARI Special Publication 48:137-148.
11. Liu, S. Y., H. S. Tsay, H. C. Huang, M. F. Hu and C. C. Yeh. 1987. Comparison on growth characteristics and nutrient composition between plants of *Anoectochilus* species from mass vegetative propagation by tissue culture. J. Agric. Res. China 36:357-366.
12. Liu, C. M. 1997. Studies on tissue culture of *Bupleurum marginatum*. Master thesis, Graduate Institute of Chinese Pharmaceutical Sciences, China Medical College, Taichung, Taiwan.
13. Pezzuto, J. M. 1997. Plant derived anticancer agents. Biochemical Pharmacology 53:121-133.
14. Shiau, Y. J., U. C. Chen and H. S. Tsay. 1998. Tissue culture of *Anoectochilus formosanus* Hayata. III. The influence of seed maturity and pretreatment on ger- mination and seedling development. Agric. Assoc. China 183:69-78.
15. Shiau, Y. J., U. C. Chen, H. M Lin, W C. Tsai and H. S. Tsay. 1996. Studies on flowering adjustment and pollination of *Anoectochilus formosanus* Hayata. J. Agric. Res. China 45:250-259.
16. Shiau, Y. J., U. C. Chen, C. Y. Lu and H. S. Tsay. 1995. Tissue culture of *Anoectochilus fomosanus* Hayata. I. Studies on the improvement of seed germination. J. Agric. Res. China 44:279-286.
17. Tsai, C. W. 1994. Studies on the suspension cell and protoplast culture of *Angelica sinensis*. Master thesis, Graduate Institute of Chinese Pharmaceutical Sciences, China Medical College, Taichung, Taiwan.
18. Tsai, W. C. 1996. Embryogenic callus culture and analysis of medicinal component of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. Master thesis, Graduate Institute of Agronomy, National Chung-Hsing Univ., Taichung, Taiwan.
19. Tsay, H.S. and H.L. Huang. 1997. Immature embryo culture of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. Acta. Hort. 447:207-209.
20. Tsay, H. S., W. D. Chang, C. C. Chen and Y. S. Chang. 1994. The production of imperatorin from *Angelica dahurica* var. formosana by cell suspension culture. Agric. Assoc. China 168:33-48.
21. Tzeng, B. K. 1996. Chinese medicine in the United States and it perspective. Bioinductry 7(1):1-5.
22. Wang, M. J. 1995. Studies on shoot tip culture and saikosaponin A, C, and D content in suspension cells of *Bupleurum falcatum* cv. Taianung No. 1. Master thesis, Graduate Institute of Agronomy,

National chung-Hsing Univ. Taichung, Taiwan.
23. Yeh, F. T., W. W. Huang, C. C. Chang, C. Na and H. S. Tsay. 1994. Tissue culture of *Dioscorea doryophora* Hance. II. Establishment of suspension cell culture and the measurement of diosgenin content. Chinese Agron. J. 4:257-268.

圖 1-2. 將台灣金線連之莖節先培養於含有 5ppm BA 及 0.3% 活性碳之液體 MS 基礎培養基 3-4 星期後，再移植到含有相同成分之固體培養基，大量繁殖效果極佳 (1)。經上述培養基培養三個月後之正常生長植株及及根系 (2)。

Fig. 1-2. *In vitro* multiplication and rooting in *Anoectochilus formosanus* shoot tip and node segment explants when cultured on MS basal salts with 5 mg/l benzyladenine and 0.3% charcoal. (1) Multiple shoot formed after one month of culture. (2) Elongation of shoot after three months of culture.

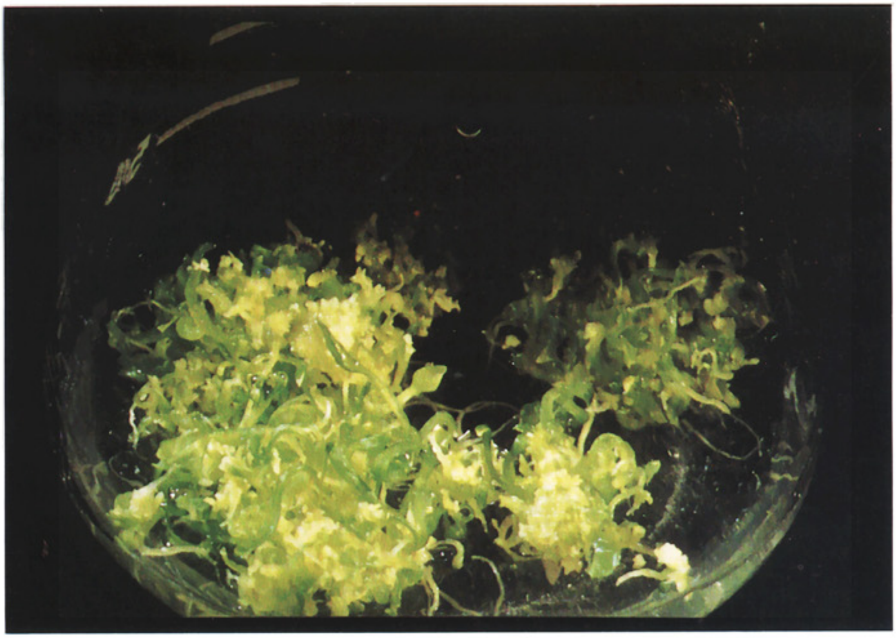

圖 3. 由擬胚化癒合組織分化而來之大量當歸植株。
Fig. 3. Mass propagation of *Angelica sinensis* via somatic embryogenesis. Large number of plantlets were formed when embryogenic callus derived from immature embryos was cultured in MS basal medium supplemented with 0.5 mg/l kinetin.

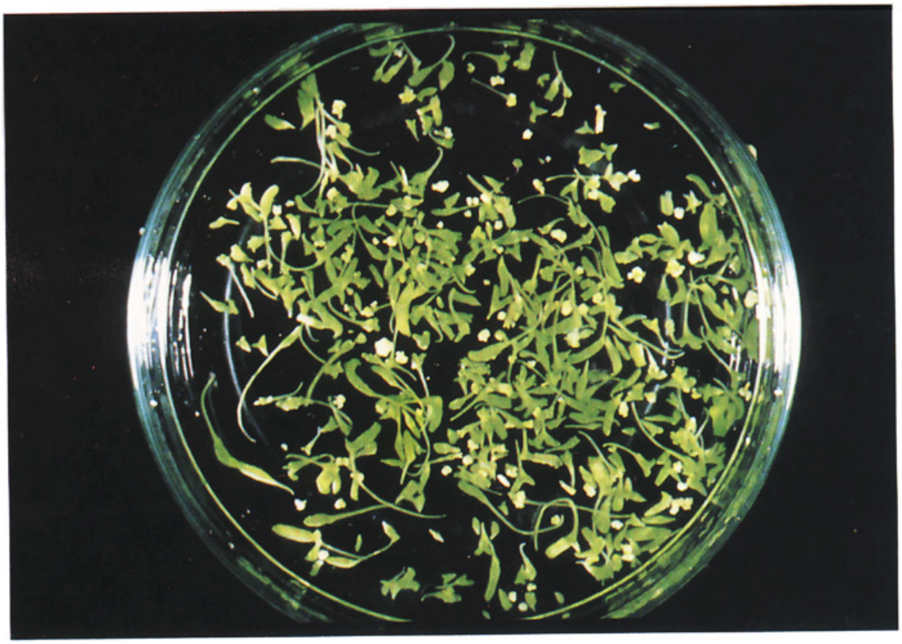

圖 4. 由當歸懸浮細胞發育形成之體胚及體胚苗。
Fig. 4. Embryogenic callus was cultured in liquid MS medium, where it formed suspension cultures that developed further into somatic embryos and germinating embryos.